

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2005 年 7 月 21 日 (21.07.2005)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2005/066206 A1

(51) 国際特許分類⁷: C07K 14/525, A61K
38/00, 47/48 // C12N 15/09

1 丁目 2 番 3 号 株式会社林原生物化学研究所内
Okayama (JP).

(21) 国際出願番号: PCT/JP2005/000032

(74) 代理人: 須磨 光夫 (SUMA, Mitsuo); 〒1050004 東
京都港区新橋 5-19-15 A. D T A I H E I
B L D G. 5 階 Tokyo (JP).

(22) 国際出願日: 2005 年 1 月 5 日 (05.01.2005)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が
可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR,
BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA,
NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE,
SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2004-001427 2004 年 1 月 6 日 (06.01.2004) JP

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護
が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA,
SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ,
BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE,
BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 株
式会社林原生物化学研究所 (KABUSHIKI KAISHA
HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU KENKYUJO)
[JP/JP]; 〒7000907 岡山県岡山市下石井 1 丁目 2 番
3 号 Okayama (JP).

(71) 出願人 および

(72) 発明者: 真弓 忠範 (MAYUMI, Tadanori) [JP/JP]; 〒
6512273 兵庫県神戸市西区梶台 5 丁目 1 番地の 1 グ
ラスアリーナ西神中央 9 0 7 号 Hyogo (JP). 堤 康央
(TSUTSUMI, Yasuo) [JP/JP]; 〒5630105 大阪府豊能郡
豊能町新光風台 2 丁目 2 0 番地の 1 Osaka (JP). 中川
晋作 (NAKAGAWA, Shinsaku) [JP/JP]; 〒5810045 大阪
府八尾市西木の本 4 丁目 4 番地の 1 Osaka (JP).

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部
分、請求に基づき国際事務局から入手可能

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 太田 恒孝 (OHTA,
Tsunetaka) [JP/JP]; 〒7000907 岡山県岡山市下石井

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される
各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語
のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: TNF ANTAGONISTS AND TNF INHIBITORS COMPRISING THE SAME AS THE ACTIVE INGREDIENT

(54) 発明の名称: TNF アンタゴニスト及びそれを有効成分とする TNF 阻害剤

(57) Abstract: It is intended to provide tumor necrosis factor mutant proteins, in particular, tumor necrosis factor mutant proteins specific for TNF-R1 or TNF-R2, and tumor necrosis factor inhibitors or tumor necrosis factor preparations comprising the same as the active ingredient. This object can be achieved by providing a tumor necrosis factor mutant protein having an amino acid sequence derived from the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 in Sequence Listing by the substitution of one or more amino acid residues at the 29-, 31-, 32-, 145-, 146- and 147-positions (counted from the N-end) and the amino acid residues at the 84- to 89-positions by other amino acid residue(s) and a tumor necrosis factor inhibitor or a tumor necrosis factor preparation comprising the same as the active ingredient.

(57) 要約: この発明は、腫瘍壊死因子変異体蛋白質、とりわけ、TNF-R1 又は TNF-R2 特異的な腫瘍壊死因子変異体蛋白質、並びにそれを有効成分とする腫瘍壊死因子阻害剤又は腫瘍壊死因子製剤を提供することを課題とするものであり、配列表における配列番号 1 で表されるアミノ酸配列における N 末端から 29、31、32、145、146 及び 147 番目のアミノ酸残基又は 84 乃至 89 番目のアミノ酸残基のうち、1 又は 2 以上が他のアミノ酸残基に置換されている腫瘍壊死因子変異体蛋白質及びそれを有効成分とする腫瘍壊死因子阻害剤又は腫瘍壊死因子製剤を提供することにより前記課題を解決する。

WO 2005/066206 A1

明 細 書

TNFアンタゴニスト及びそれを有効成分とするTNF阻害剤

技術分野

- [0001] この発明は腫瘍壊死因子(以下、本明細書において「TNF」と略記する)変異体蛋白質、とりわけ、TNF受容体TNF-R1又はTNF-R2に特異的なTNFアンタゴニスト又はTNFアゴニスト、及び、それらを有効成分とするTNF阻害剤又はTNF製剤に関するものである。

背景技術

- [0002] TNFは、多くの腫瘍細胞に対して、極めて強力な抗腫瘍作用を発揮することから、抗癌剤としての活用が囑望されてきた。しかしながら、TNFは、細胞障害活性による生体への副作用が大きすぎるため、医薬品としてまだ利用されるには至っていない。また、TNFは、癌や感染症などの疾病時に患者の生体内で産生され、炎症反応を引き起こし、場合によっては症状を重篤化する因子ともなり得る。このため、TNFの作用を調節する方法の開発が望まれている。TNFの作用を調節する方法としては、TNFと結合する抗体を生体に投与し、TNFの活性を中和する方法があり、当該抗体を有効成分とする医薬品がすでに開発されている。しかしながら、この方法は、TNFによる有益な生体防御能のすべてを喪失させる恐れがある。
- [0003] ところで、TNF受容体として、分子量55キロダルトンのTNF受容体(以下、「TNF-R1」と呼称する。)及び分子量75キロダルトンのTNF受容体(以下、「TNF-R2」と呼称する。)が存在することが知られている。ヴァン・オスターデ・エックス(Van Osta de X)、タベアニアー・ジェイ(Tavernier J)、プランジェ・ティー(Prange T)、フィアーズ・ダブル(Fiers W)、ローカリゼーション・オブ・ジ・アクティブ・サイト・オブ・ヒューマン・ツモア・ネクロシス・ファクター(hTNF)・バイ・ミューテーション・アナリシス(Localization of the active site of human tumour necrosis factor (hTNF) by mutational analysis)、ザ・エンボ・ジャーナル(The ENBO Journal)、1991年、第10巻、第4号、827乃至836頁には、マウスTNF-R2に結合しないヒト由来の α 型TNF(以下、「TNF- α 」と呼称する)は、両方の受容体と結合す

るマウスTNF- α とは異なった生物作用を発揮することが報告されている。したがって、TNF-R1又はTNF-R2のどちらか一方にのみに選択的に結合するTNF変異体蛋白質は、従来のTNFの持つ生物作用とは異なった作用を発揮することが期待される。

- [0004] TNF-R1又はTNF-R2のどちらか一方にのみ選択的に結合する、すなわち、受容体特異的なTNF変異体蛋白質を作製するにあたり、ヴァン・オスターデ・エックス(Van Ostade X)等は、上記文献において、TNF- α におけるTNF-R1又はTNF-R2との結合部位を変異導入法によりそれぞれ調べ、その結果、TNF- α におけるN末端から29乃至34番目、86番目及び146番目のアミノ酸残基への変異導入は、TNF-R2への結合力を、また、143乃至145番目のアミノ酸残基への変異導入はTNF-R1への結合力を低減させることが開示されている。とりわけ、N末端から32番目のアルギニン(R)がトリプトファン(W)に、N末端から86番目のセリン(S)がトレオニン(T)に変異されたTNF- α 変異体蛋白質は、TNF-R1への結合力を保持したまま、TNF-R2との結合力を著しく低減することを開示されている。さらに、特開平6-256395号公報、特開平7-285997号公報、ツアング・エックスエム(Zhang XM)、ウエーバー・アイ(Weber I)、チェン・エムジェイ(Chen MJ)、サイトーディレクテッド・ミューテーション・アナリシス・オブ・ヒューマン・ネクロシス・ファクター・アルファ・レセプター・バインディング・サイト・アンド・ストラクチャー・ファンクショナル・リレーションシップ(Site-directed mutational analysis of human tumor necrosis factor-alpha receptor binding site and structure-functional relationship)、ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)、1992年、第267巻、第33号、24069乃至24075頁、及び、ローチャー・エイチ(Loetscher H)、スチューバー・ディー(Stueber D)、バンナー・ディー(Banner D)、マッケイ・エフ(Mackay F)、レスロイアー・ダブル(Lesslauer W)、ヒューマン・ツモア・ネクロシス・ファクター・アルファ(ティー・エヌ・エフ・アルファ)・ミュータンツ・ウィズ・エクスクルーシブ・スペシフィシティ・フォー・ザ・55-kDa・オア・75-kDa・TNF・レセプターズ(Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-

kDa TNF receptors)、ザ・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・ケミストリー(The Journal of Biological Chemistry)、1993年、第268巻、第35号、26350乃至26357頁を参照すると、受容体特異性をTNF変異体蛋白質に付与するためには、TNF- α のN末端から29乃至34、81乃至89、又は、143乃至147番目のアミノ酸残基に変異導入することが有望であると考えられる。なお、上記文献において、受容体特異的なTNF- α 変異体蛋白質が作成されており、それらはTNFとしての活性を保持するいわゆるアゴニストである。これらは、TNFの薬効を期待してのTNF製剤としての利用が期待できる。

- [0005] 一方、TNFとしての活性が弱い或全くないTNF変異体蛋白質、つまりTNFアンタゴニストは、どちらか一方のTNF受容体に選択的に結合するので、生体内で産生されるTNFを残る一方のTNF受容体のみに選択的に結合させることができる。しかしながら、上記文献にはどちらか一方のTNF受容体に特異的なアンタゴニスト活性を有するTNF変異体蛋白質は開示されておらず、受容体特異的なTNFアンタゴニストの開発が望まれる。

発明の開示

- [0006] 斯かる状況に鑑み、この発明は、TNF変異体蛋白質、とりわけ、TNF-R1又はTNF-R2特異的なTNFアンタゴニスト、並びにそれを有効成分とするTNF阻害剤を提供することを課題とするものである。
- [0007] 本発明者等は、TNF受容体の一種であるTNF-R1又はTNF-R2特異的なTNFアンタゴニストを得るべく、網羅的にTNF変異体蛋白質を作製し、スクリーニングした結果、TNF-R1との結合力のみが野性型TNFと比べて著しく弱いTNF変異体蛋白質、又は、TNF-R2との結合力のみが野性型TNFと比べて著しく弱いTNF変異体蛋白質を得ることに成功した。これらのTNF変異体蛋白質は、TNFといずれか一方のTNF受容体のみとの結合を拮抗阻害することが可能なTNFアンタゴニスト、又は、いずれか一方のTNF受容体にのみに選択的に結合して、TNF様の作用を示すTNFアゴニストであることを確認し、この発明を完成するにいたった。
- [0008] すなわち、この発明は、TNF-R1又はTNF-R2に特異的なTNFアンタゴニスト又はTNFアゴニスト、及び当該蛋白質を有効成分とするTNF阻害剤を提供することに

よって前記課題を解決するものである。

発明を実施するための最良の形態

- [0009] この発明でいうTNF-R1特異的とは、TNF-R2との結合力が著しく弱く、その結果、主にTNF-R1と結合する能力が顕著であることを意味し、TNF-R2特異的とは、TNF-R1との結合力が著しく弱く、その結果、主にTNF-R2と結合する能力が顕著であることを意味する。この発明でいうTNFアンタゴニストとは、TNF受容体と結合するが野性型TNFよりも活性が弱いとか全く示さない蛋白質を意味する。この発明のTNFアンタゴニストは、TNF-R1又はTNF-R2のどちらか一方の受容体との結合力が強ければ強いほど、残る一方の受容体への結合が弱ければ弱いほど好ましい。
- [0010] この発明のTNF-R1又はTNF-R2に特異的なTNFアンタゴニストは、配列表における配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するTNF- α をコードするDNAに、所望の位置にNNS配列(Nは塩基がA、T、G又はCを、Sは塩基がG又はCを示す)を常法のPCR技術などにより導入し、ファージディスプレイ法により、所期の特性を有するクローンを選出することによって得ることができる。また、TNF- α の代わりに、配列表における配列番号1で表されるアミノ酸配列のN末端から11、65、90、98、112、128番目のリジン残基のうち1又は2以上が欠失、又は他のアミノ酸残基に置換した、好ましくは、配列表における配列番号2乃至4の塩基配列に併記されるアミノ酸配列を有するTNFリジン変換体(以下、単に「リジン変換体」という)を基にすることもできる。具体的にいえば、まず、TNF-R1又はTNF-R2への結合力を変化させるために、配列表における配列番号1で表されるアミノ酸配列、又は配列表における配列番号2乃至4の塩基配列に併記されるアミノ酸配列において、それらのN末端から29、31、32、145、146及び147番目のアミノ酸残基をランダムなアミノ酸に置換(配列表における配列番号5)するか、また、それらのN末端から84、85、86、87、88及び89番目のアミノ酸残基をランダムなアミノ酸に置換(配列表における配列番号7)するために、常法のオリゴDNA合成技術、PCR技術、DNAライゲーション技術などを駆使して、上記位置のアミノ酸残基のコドンにNNSに置換したTNF変異体蛋白質をコードするDNA(配列表における配列番号6又は8)を作製する。得られたDNAはファージライブラリーを作製するために、ファージミドベクターに組み込み、蛋白質を発現

させた後、TNF-R1 (GENBANK M58286に開示されるアミノ酸配列を有する蛋白質) 又はTNF-R2蛋白質 (GENBANK M55994に開示されるアミノ酸配列を有する蛋白質) と結合するファージクローンを、表面プラズモン共鳴原理を利用した機器などを用いてパニング法を行うことにより選択する。得られたクローンは、さらに、残る一方の受容体 (TNF-R2又はTNF-R1) との結合性を調べ、2つの受容体に対する結合力に差を生じたクローンを選択し、基になったTNF- α あるいはTNFリジン変換体の2分の1、好ましくは10分の1、さらに好ましくは1,000分の1、最も好ましくは、検出可能レベル以下までに片方の受容体への結合力が消失したクローンを選択する。選択されたクローンを、ヒト喉頭癌由来の細胞株HEp-2細胞 (ATCC CCL-23) 又はマウス結合組織由来の細胞株L-M細胞 (ATCC CCL-1.2) などのTNF標的細胞を用いる公知のバイオアッセイによってその生物活性を測定する。その結果、活性が低いもの、例えば、TNF- α の2分の1、好ましくは、10分の1、さらに好ましくは1,000分の1、最も好ましくは、検出可能レベル以下までに細胞障害活性が消失したファージクローンを選別する。

- [0011] 斯くして得られるこの発明のTNFアンタゴニストは、配列表における配列番号1で表されるアミノ酸配列を有するTNF- α 、又は、配列表における配列番号2乃至4の塩基配列に併記されるアミノ酸配列を有するTNFリジン変換体におけるN末端から、29、31、32、145、146及び147番目のアミノ酸残基、又は、84乃至89番目のアミノ酸残基の一部又は全てが他のアミノ酸又は終止コドンに置換されている。これらのTNF変異体蛋白質は、TNF-R1又はTNF-R2のいずれかに特異的に結合するが、野性型TNFよりも活性が低いか全く示さない、いわゆる、TNF-R1又はTNF-R2特異的なTNFアンタゴニストであることから、生体に投与された場合、TNF-R1又はTNF-R2のどちらか一方と選択的に結合するので、生体内で産生されたTNFが選択された方のTNF受容体に結合することを阻害する。したがって、生体内で産生されたTNFに対して過剰量のこの発明のTNFアンタゴニストを投与することにより、生体内で産生されたTNFの作用をどちらか一方のTNF受容体を介してのTNF活性のみに制御することができる。

- [0012] この発明のTNF-R1特異的なTNFアンタゴニストとしては、配列表における配列番

号1で表されるアミノ酸配列におけるN末端から29番目のアミノ酸残基がアルギニン、ヒスチジン又はセリン、31番目がアルギニン、アスパラギン、グルタミン酸、プロリン又はセリン、32番目がヒスチジン、メチオニン、トレオニン又はチロシン、145番目がアラニン、アスパラギン、アスパラギン酸又はセリン、146番目がアスパラギン、グリシン、メチオニン又はセリン、及び、147番目がアラニン、アスパラギン、プロリン、トレオニン又は終止コドンで置換されるか、又は84番目がアラニン、トレオニン、セリン又はグリシン、85番目がプロリン、トレオニン又はグリシン、86番目がアラニン、グリシン、トレオニン又はプロリン、87番目がチロシン、イソロイシン又はヒスチジン、88番目がグルタミン、アスパラギン又はセリン、及び、89番目がアルギニン、ヒスチジン又はグルタミンで置換されたTNF変異体蛋白質が挙げられ、例えば、配列表における配列番号9乃至13又は配列番号19乃至22で表されるアミノ酸配列を有するTNF変異体蛋白質が好適であり、この発明のTNF-R2特異的なTNFアンタゴニストとしては、145番目がアラニン、リジン又はアルギニン、146番目がグルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸又はトレオニン、及び、147番目がトレオニン又はアスパラギン酸で置換されたTNF変異体蛋白質が挙げられ、例えば、配列表における配列番号14乃至18で表されるアミノ酸配列を有するTNF変異体蛋白質が好適である。

- [0013] 一方、本発明のTNFアンタゴニストを検索するにあたり、TNF-R1と特異的に結合するも、活性を保持しているか、活性の低下が少ないTNF変異体蛋白質が得られた。これらの蛋白質は、TNF-R2への結合能を欠いており、野性型TNFとは異なった生物活性を発揮することが期待されるものである。このような蛋白質はTNFアゴニストとして作用すると考えられ、配列表における配列番号1で表されるアミノ酸配列におけるN末端から29番目がロイシン、グルタミン、トレオニン又はリジン、31番目がアルギニン、グリシン、セリン又はアラニン、32番目がトリプトファン、チロシン、アスパラギン酸又はグリシン、146番目がグルタミン酸、アラニン又はセリン、及び、147番目がセリン、アルギニン又はトレオニンで置換されているか、又は、84番目がトレオニン、セリン又はアスパラギン、85番目がセリン、リジン、プロリン、チロシン、アルギニン、トレオニン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸又はアラニン、86番目がヒスチジン、トレオニン、ロイシン、アスパラギン、アラニン、バリン、リジン、セリン、グルタミン、

グリシン、アルギニン又はアスパラギン酸、88番目がセリン、プロリン、トレオニン、アスパラギン、アラニン、グリシン、アルギニン又はグルタミン、及び、89番目がアスパラギン酸、ヒスチジン、リジン、グリシン、セリン、プロリン、アラニン、グルタミン、フェニルアラニン又はアルギニンで置換されたTNF変異体蛋白質が挙げられ、例えば、配列表における配列番号37乃至59で表されるアミノ酸配列を有するTNF変異体蛋白質が好適である。

- [0014] この発明でいうTNFリジン変換体とは、本発明者らによって、TNF- α の生物活性を低減させないように水溶性の高分子に結合させるために、TNF- α のアミノ酸配列のN末端から11、65、90、98、112及び128番目のアミノ酸残基の1又は2以上のリジン残基を他のアミノ酸残基に置換又は欠失したものである(欧州公開特許EP1354893号明細書参照)。配列表における配列番号2乃至4の塩基配列に併記されるアミノ酸配列を有するTNFリジン変換体は、TNF- α と比較して、同等又は同等以上の活性を有しており、実質的にTNF-R1及びTNF-R2への結合力についても同等である。したがって、この発明のTNF-R1又はTNF-R2特異的なTNFアンタゴニストを水溶性の高分子に結合せしめて複合体として医薬品として利用する場合、蛋白部分にリジン残基を有しないか、リジン残基数を低減させたTNFリジン変換体が有利である。配列表における配列番号9乃至22で表される上記のこの発明のTNFアンタゴニスト、又は配列表における配列番号37乃至59で表される上記のこの発明のTNFアゴニストは、TNFリジン変換体を基にして作製されており、全くリジン残基を有していないか又は1つしかリジン残基を有していないので、水溶性の高分子と複合体を作製するうえで好適な例であるといえる。なお、この発明のTNF変異体蛋白質を水溶性の高分子と結合することを意図しないならば、配列表における配列番号9乃至22又は37乃至59で表されるアミノ酸配列におけるN末端から11、65、90、98、112及び128番目のアミノ酸残基の1又は2以上が野性型TNFと同様にリジン残基であってもよく、それらの全てがリジン残基であってもかまわない。

- [0015] この発明のTNF変異体蛋白質は、それらをコードするDNA、例えば、配列表における配列番号23乃至36又は60乃至82で表される塩基配列のいずれかを有するDNAを用いて、常法の遺伝子工学技術により製造することができる。すなわち、必要

に応じて、この発明のTNF変異体蛋白質をコードするDNAのいずれかをPCR反応によって増幅した後、蛋白質発現用のプラスミドベクターに組み込んで大腸菌などの宿主へ導入して形質転換し、得られる形質転換体から目的とする蛋白質を産生するクローンを選択し、それを培養することによって所望量得ることができる。形質転換体の培養物から蛋白質を採取するには、例えば、透析、塩析、濾過、濃縮、遠心分離、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、ゲル電気泳動、等電点電気泳動などの蛋白質を精製するための汎用の方法を適用すればよく、必要に応じて、これらの方法は適宜組み合わせて用いられる。

- [0016] この発明のTNF変異体蛋白質は、生体内への安定性を向上させるために、適宜の水溶性の高分子を人為的に結合せしめることができる。この発明で用いる水溶性の高分子は、実質的に水溶性であって、とりわけ、生体にとって無害かつ抗原となり難い非蛋白質性のものが好ましい。具体的には、例えば、ポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール、ポリビニルピロリドン、ポリプロピレングリコールなどの単独重合体、エチレングリコールとビニルアルコール、プロピレングリコールなどとの共重合体又はそれらの誘導体などの合成高分子や、エルシナン、デキストラン、ヒドロキシエチルセルロース、プルラン、メチルセルロースなどの天然高分子が挙げられ、このうち、分子量が揃った調製物を入手し易い点で、ポリエチレングリコールの単独重合体、ポリエチレングリコールと他の水溶性の高分子との共重合体及びそれらの誘導体が好ましい。なお、水溶性の高分子の分子量は、平均分子量として、通常、500乃至100,000ダルトン、好ましくは、1,000乃至50,000ダルトンの範囲内から選択すればよい。分子量が均一化された水溶性の高分子を用いたい場合には、蛋白質への結合反応に先だって、例えば、分別沈澱、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの汎用の方法によって分子量分画することも随意である。また、水溶性の高分子の形状は、直鎖構造及び分岐構造のものいずれも用いることができるが、立体障害性の観点から分岐構造のものが好ましく用いられる。水溶性の高分子の種類や複合体の最終用途にもよるけれども、水溶性の高分子の分子量が上記範囲を下回ると体内動態を改善し難くなり、逆に、上記範囲を上回ると、複合体の生理活性が低下しすぎて、医薬品

として使用できなくなることがある。

- [0017] TNF変異体蛋白質へ斯かる水溶性の高分子を結合せしめるには、遊離のアミノ基へ特異的に反応して共有結合を形成する試薬により別途活性化させておいた水溶性の高分子を蛋白質に反応させるか、あるいは、遊離のアミノ基へ特異的に反応する官能基を有する多官能試薬により、蛋白質と水溶性の高分子とを架橋すればよい。反応方法としては、欧州公開特許EP1354893号明細書に記載されている方法に準じて行うことができる。また、斯界において汎用される方法、例えば、特開昭62-289522号公報などに記載されたエステル結合法、アミド結合法などを用いてもよい。蛋白質部分と水溶性の高分子との間に形成される結合は、安定な共有結合が形成されるアミド結合法によるものが好ましい。
- [0018] 反応方法にもよるけれども、反応開始時における蛋白質と水溶性の高分子との割合は、モル比で1:0.1乃至1:100、好ましくは、1:0.5乃至1:50、最も好ましくは、1:1乃至1:10の範囲で加減する。一般に、この範囲を下回ると蛋白質同士の結合が顕著となり、反対に、この範囲を上回ると水溶性の高分子同士の結合が顕著となる。いずれにしても、反応と反応後の精製の効率を低下させることとなり、通常、上記の範囲で加減するのが望ましい。反応の際の温度、pH及び反応時間は、蛋白質が失活又は分解し難く、かつ、望ましくない副反応が最小になるように設定され、具体的には、反応温度を0乃至100℃、好ましくは、20乃至40℃、pHを0.1乃至12、好ましくは、pH5乃至9とし、0.1乃至50時間、好ましくは、10時間以内に反応が完結するように設定する。斯くして得られたTNF変異体蛋白質と水溶性の高分子との複合体は、TNF変異体蛋白質を精製する場合と同様の方法によって精製することができ、最終使用形態に応じて、例えば、濃縮、塩析、遠心分離、凍結乾燥などの方法により液状又は固状とする。
- [0019] この発明のTNF変異体蛋白質、又はそれらと水溶性の高分子との複合体は、感受性疾患を治療及び／又は予防するための、又は、炎症などの症状を緩和するためのTNF阻害剤又はTNF製剤として極めて有用である。この発明でいう感受性疾患とは、この発明のTNF阻害剤又はTNF製剤を単独で投与するか、あるいは、他の薬剤とともに投与することによって治療、予防、又は症状を緩和し得る疾患全般を意味し、

具体的には、生体内でのTNFの過剰発現あるいは過剰投与により引き起こされる各種疾病、TNFの過剰発現を引き起こす各種疾病、又はTNFの腫瘍壊死作用により治療効果が認められる各種疾病であり、個々の疾患としては、例えば、結腸癌、直腸癌、胃癌、甲状腺癌、舌癌、膀胱癌、絨毛癌、肝癌、子宮癌、咽頭癌、肺癌、乳癌、悪性黒色腫、神経芽細胞腫、卵巣腫瘍、睾丸腫瘍、骨肉腫、膵臓癌、副腎腫、甲状腺腫、脳腫瘍、悪性黒色腫、菌状息肉症などの固形腫瘍、白血病、リンパ腫などの血液系腫瘍、潰瘍性大腸炎、クローン病、慢性関節リュウマチ、アレルギー、乾癬などの自己免疫疾患、悪液質、慢性及び急性炎症、関節炎、敗血症、播種性血管内凝固症候群、移植拒絶反応、対宿主移植片疾患、感染、卒中、虚血、急性呼吸困難症候群、再狭窄、脳障害、AIDS、SARS、骨疾患、アテローム性動脈硬化、川崎病、ベーチェット病、全身性紅斑性狼瘡、多臓器不全、マラリア、髄膜炎、劇症肝炎、ボウル病、アルツハイマー病などが挙げられる。したがって、この発明のTNF阻害剤又はTNF製剤は、斯かる疾患を治療及び／又は予防するための、又は炎症などの症状を緩和するための、医薬品として多種多様な用途を有することとなる。

[0020] この発明のTNFアンタゴニストとともにTNFを併用することにより、この発明のTNFアゴニストと同様の作用、すなわち、TNF-R1又はTNF-R2を介してのTNF活性を選択的に発揮させることが可能である。TNFとしては、TNF- α 又はTNF- β 、それらの変異体蛋白質、又は、それらと水溶性の高分子との複合体であってもよい。この発明のTNFアンタゴニストとTNFの配合量は、患者の症状に合わせて適宜設定すればよいが、片方の受容体を介してのTNF活性を実質的に発揮させないようにするためには、この発明のTNF-R1又はTNF-R2特異的なTNFアンタゴニストをTNFに比べてモル比で100,000倍以上、好ましくは500,000倍以上配合すればよい。また、上記モル比未満であっても、片方の受容体を介してのTNF活性は部分的に抑制されるので、通常と異なったTNFの作用が発揮されることやTNFの副作用の軽減化が期待できる。したがって、TNFアンタゴニストとTNFの比率は、モル比で1乃至1,000,000倍、好ましくは、10乃至1,000,000倍、さらに好ましくは100乃至1,000,000倍から選ばれる。

[0021] 適用対象となる感受性疾患の種類や症状にもよるけれども、この発明によるTNF変

異体蛋白質を含んでなるTNF阻害剤又はTNF製剤は、投与経路に応じて、1回当たりの用量として、その有効成分を0.25ng/kg体重以上、好ましくは、2.5ng乃至400mg/kg体重を投与し、用途に応じて、エキス剤、エリキシル剤、下気道吸入剤、カプセル剤、顆粒剤、眼科用徐放剤、丸剤、眼軟膏剤、口腔粘膜貼付剤、懸濁剤、乳剤、硬膏剤、座剤、散剤、錠剤、シロップ剤、浸漬剤、煎剤、注射剤、点滴剤、チンキ剤、点眼剤、点耳剤、点鼻剤、トローチ剤、軟膏剤、パップ剤、芳香水剤、鼻用噴霧剤、リニメント剤、リモナーデ剤、流エキス剤、ローション剤などの形態のものに調製することができる。

- [0022] この発明のTNF阻害剤又はTNF製剤の適用及び好適な投与量を決定するために、患者の血液中のTNF及び可溶性TNF受容体(TNF-R1及びTNF-R2)濃度、患部組織における細胞表面のTNF受容体の発現数などを、常法のエンザイムイムノアッセイ、フローサイトメトリー法又は結合アッセイ法などにより計測することは有意義である。
- [0023] この発明のTNF阻害剤又はTNF製剤は、いわゆる、投薬単位形態の薬剤をも包含するものとし、その投薬単位形態の薬剤とは、この発明のTNF変異体蛋白質を、例えば、1回当たりの用量又はその整数倍(4倍まで)若しくは約数(1/40まで)に相当する量を含んでなり、投薬に適する物理的に分離した一体の剤型にある薬剤を意味する。このような投薬単位形態の薬剤としては、例えば、カプセル剤、顆粒剤、丸剤、座剤、散剤、錠剤、注射剤、点滴剤、パップ剤などが挙げられる。
- [0024] この発明のTNF阻害剤又はTNF製剤は、有効成分としてのこの発明のTNF変異体蛋白質以外の、例えば、賦形剤、軟膏基剤、溶解剤、矯味剤、矯臭剤、着色剤、乳化剤などの薬剤一般に汎用される適宜の調剤用薬を配合することを妨げない。また、この発明の目的を逸脱しない範囲で、TNF変異体蛋白質とともに、他の有効成分として、例えば、外皮用殺菌消毒剤、創傷保護剤、消炎剤などの外皮用薬、ビタミンA剤、ビタミンB剤、ビタミンC剤、ビタミンD剤、ビタミンE剤、ビタミンK剤などのビタミン剤、カルシウム剤、無機質製剤、糖類剤、有機酸製剤、蛋白アミノ酸製剤、臓器製剤などの滋養強壮薬、クロロフィル製剤、色素製剤などの細胞賦活用薬、アルキル化剤、代謝拮抗剤、抗腫瘍性抗生物質製剤、抗腫瘍性植物成分製剤などの抗腫瘍

薬、抗ヒスタミン剤などのアレルギー用薬、抗結核剤、合成抗菌剤、抗ウイルス剤などの化学療法剤、さらには、ホルモン剤、抗生物質製剤、生物学的製剤などのこの発明のTNF変異体蛋白質以外の薬剤を1又は複数配合してもよい。

[0025] さらに、この発明のTNF阻害剤又はTNF製剤は、免疫助成剤として、例えば、アクチノマイシンD、アセグラトン、イホスファミド、ウベニメクス、エトポシド、エノシタビン、塩酸アクリラルビシン、塩酸イダルビシン、塩酸イリノテカン、塩酸エピルビシン、塩酸ゲムシタビン、塩酸ダウノルビシン、塩酸ドキソルビシン、塩酸ナイトロジェンマスタード-N-オキシド、塩酸ニムスチン、塩酸ピラルビシン、塩酸ファドゾール水和物、塩酸ブレオマイシン、塩酸プロカルバジン、塩酸ミトキサントロン、カルボコン、カルボプラチン、カルモフル、クエン酸タモキシフェン、クエン酸トレミフェン、クレスチン、酢酸メドロキシprogesteron、シクロホスファミド、シスプラチン、シゾフィラン、シタラビン、シタラビンオクホスファート、ジノスタンチンスチマラマー、酒石酸ビンレルビン、ソブゾキサン、ダカルバジン、チオテパ、テガフル、テガフル・ウラシル、テガフル・ギメスタット・オタスタットカリウム、ドキシフルリジン、ドセタキセル水和物、トレチノイン、ネオカルチノスタチン、ネダプラチン、バクリタキセル、ビカルタミド、ピシバニール、ヒドロキシカルバミド、ブスルファン、フルオロウラシル、フルタミド、ベントスタチン、ポルフィマーナトリウム、マイトマイシンC、ミトブリニトール、メトレキセート、メルカプトプリン、6-メルカプトプリンリボシド、硫酸ブレオマイシン、硫酸ビンクリスチン、硫酸ビンデシン、硫酸ビンブラスチン、硫酸ペプロマイシン、レンチナンなどの抗腫瘍薬などと組み合わせて用いることができる。また、インターフェロン、インターロイキンなどのサイトカイン、インシュリンなどのホルモン、及びそれらに対する抗体、結合蛋白質、アゴニスト、アンタゴニスト、阻害剤又は可溶性受容体とともに用いれば、いずれか一方のみでは容易に達成できない、相乗的に高い効果が得られる。

[0026] この発明のTNF阻害剤又はTNF製剤は、経口経路で適用しても非経口経路で適用しても感受性疾患の治療・予防に効果を発揮する。感受性疾患の種類や症状にもよるけれども、具体的には、例えば、患者の症状や適用後の経過を観察しながら、体重1kg当たり0.01乃至1,000mg/日、好ましくは、0.1乃至100mg/日のこの発明のTNFアンタゴニスト又はTNFアゴニストを、必要に応じて、複数回に分けて1乃

至7回／週の頻度で1週間乃至1年間に亘って経口経路で適用するか、あるいは、皮内、皮下、筋肉内、静脈内、鼻腔内、直腸内、腹腔内などの非経口経路により、注射又は点滴により適用する。この発明のTNF変異蛋白質と水溶性の高分子との複合体は、安定であって、血液中のプロテアーゼなどによって分解され難く、しかも、生体における滞留時間が、TNF- α やTNF変異体蛋白質よりも有意に長く、投与経路によっては10倍以上にも達することから、同一の感受性疾患に対して同一の経路で適用する場合、投与量を有意に少なくすることができる実益がある。

[0027] 以下、この発明の詳細につき、実験例に基づいて説明する。

[0028] 実験例1: TNF変異体蛋白質をコードするDNAライブラリーの作製及びスクリーニング

常法にしたがって、欧州公開特許EP1354893号明細書に記載の実施例2に開示されているヒトTNFリジン変換体、すなわち、TNF- α の11番目、65番目、90番目、98番目、112番目及び128番目のリジン残基が、それぞれ、メチオニン、セリン、プロリン、アルギニン、アスパラギン、プロリン残基に置換された蛋白質をコードするDNA(配列表における配列番号2)を鋳型として、配列表における配列番号83及び84で表されるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、常法にしたがってPCRを行い、さらに、得られたPCR産物を鋳型にして、配列表における配列番号85及び86で表されるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、常法にしたがってPCRを行い、N末端から29、31、32、145、146、147番目のアミノ酸残基がランダムなアミノ酸残基に置換された配列表における配列番号5で表されるTNF変異体蛋白質をコードするDNA(配列表における配列番号6)を得た。また、同様にして、ヒトTNFリジン変換体DNA(配列表における配列番号2)を鋳型にして、配列表における配列番号85及び87で表されるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、常法にしたがってPCRを行い、さらに、得られたPCR産物と配列表における配列番号88で表されるオリゴヌクレオチドプライマーを用いて、常法にしたがってPCRを行い、N末端から84乃至89番のアミノ酸がランダムなアミノ酸に置換された配列表における配列番号7で表される蛋白質をコードするDNA(配列表における配列番号8)を得た。

[0029] これらのDNAを常法にしたがって、ファージミドベクターpCANTAB 5E(アマシ

ヤムバイオサイエンシーズ社製)へ導入し、N末端から29、31、32、145、146、147番目のアミノ酸残基の全てがランダムなアミノ酸残基に置換されたTNF変異体蛋白質、又は、84乃至89番のアミノ酸残基の全てがランダムなアミノ酸残基に置換されたTNF変異体蛋白質を発現したファージミドライブラリーを得た。このライブラリーに対して、TNF-R1 (GENBANK M58286に開示されるアミノ酸配列を有する蛋白質)をセンサーチップに固定化した市販の表面プラズモン共鳴を利用した検出機器(商品名『BIACORE 2000』、ピアコア株式会社販売)を用いるパニング法を3回繰り返し適用することによって、TNF-R1に結合するファージクローン、また、同様にして、TNF-R2 (GENBANK M55994に開示されるアミノ酸配列を有する蛋白質)を固定化したセンサーチップにより、TNF-R2に結合するファージクローンを得た。

- [0030] かくして得られたTNF-R1に結合するクローンに対してはTNF-R2を固定化したセンサーチップを、TNF-R2に結合するクローンに対してはTNF-R1を固定化したセンサーチップを用いた上記表面プラズモン共鳴を利用した検出機器により、受容体への結合力を測定し、受容体への結合力に差を有するクローンを選別した。さらに、得られたファージクローンのDNAを鋳型として、配列表における配列番号89(制限酵素NdeI切断部位、開始コドン、及びTNF変異体蛋白質の5'末端付近の塩基配列を有する)及び配列番号90(制限酵素BamHI切断部位、終止コドン、TNF変異体蛋白質の3'末端付近の塩基配列を有する)で表されるオリゴヌクレオチドをプライマーとして、常法のPCR法により、プライマー配列に特異的なDNAを増幅した後、制限酵素NdeI及びBamHIにより消化してDNA断片とした。得られたDNA断片を、T7プロモーター領域、T7ターミネーター領域、アンピシリン耐性遺伝子領域及びColE1・Ori領域を有するプラスミドベクター(商品名『pET-3a』、ノバジェン社製)へ、常法にしたがって、その上記制限酵素部位に導入した。さらに、得られたプラスミドを大腸菌BL21DE3株へ導入し、TNF変異体蛋白質産生用の大腸菌を得た。常法により、得られた大腸菌を培養した後、遠心分離により菌体を回収し、TES緩衝液(pH 8.0)(20mMトリス塩酸、10mMエチレンジアミン4酢酸、及び0.5M塩化ナトリウム)にて2回洗浄後、0.2mg/mlリゾチームを含むTES緩衝液(pH8.0)に加え、常法にしたがい超音波処理し、遠心分離し、産生されたTNF変異体蛋白質を含む残さ

を回収した。これを1(w/v)%トリトンエックス-100を含むTES緩衝液に加え、攪拌後に遠心分離して上清を除く操作を3回行い、得られた沈澱物を、8Mグアニジン塩酸塩及び50mMジチオスレイトールを含む50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.0)に加え、室温遮光下で16時間攪拌し、遠心分離して上清を回収した。これに100倍量の1Mトリス、0.9(w/v)%塩化ナトリウム、0.4M L-アルギニン塩酸塩、2.5mM還元型グルタチオン、0.5mM酸化型グルタチオン、0.05(w/v)%ツイーン20を含む水溶液に少量ずつ徐々に攪拌しつつ加えた後、4℃で16時間置した。これを4倍量の0.1(w/v)%ウシ血清アルブミンを含むリン酸食塩緩衝液(pH7.2)に加え、pHを6.5乃至7.5に調整した後、常法にしたがって、Q-セファロース(ファルマシア社製)、MonoQ HR5/5(ファルマシア社製)、スーパーロース12 HR 10/30(ファルマシア社製)及び/又は抗TNF- α 抗体カラムクロマトグラフィーにより、それぞれのTNF変異体蛋白質を順次精製した。

- [0031] 得られたTNF変異体蛋白質は、常法のHEp-2細胞又はL-M細胞を標的細胞として用いたバイオアッセイを適用することによって細胞障害活性を調べた。また、常法のDNAシーケンス法によって、それぞれのクローンのDNAの変異導入箇所の塩基配列を解読し、どのアミノ酸残基又は終止コドンに置換されているか調べた。また、細胞障害性及び受容体への結合力についての評価方法は、上記と同様の方法により大腸菌で産生させた組換え型TNF- α を対照にして、次のように設定した。
- [0032] 「4」:組換え型TNF- α よりも結合力若しくは細胞障害活性が2倍以上向上
「3」:組換え型TNF- α よりも結合力若しくは細胞障害活性がほぼ同等(0.5乃至2倍)
「2」:組換え型TNF- α よりも結合力若しくは細胞障害活性が0.5乃至0.1倍に低下
「1」:組換え型TNF- α よりも結合力若しくは細胞障害活性が0.001乃至0.1倍に低下
「0」:組換え型TNF- α よりも結合力若しくは細胞障害活性が0.001倍以下に低下
「-」:測定せず
- [0033] 結果を表1(29、31、32、145、146及び147番目のアミノ酸残基が置換されてい

るTNF変異体)及び表2(84乃至89番目のアミノ酸残基が置換されているTNF変異体)に示す。

[0034] [表1]

クローン 番号	バイオアッセイ		受容体結合力		変異位置と変異後のアミノ酸残基及びそのコドン						備考
	HEp-2	L-M	TNF-R1	TNF-R2	29	31	32	145	146	147	
TNF- α (対照)	3	3	3	3	Leu ctg	Arg cgc	Arg cgg	Ala gcc	Glu gag	Ser tct	配列番号1
TNFリジン 変換体	3	3	3	3	Leu ctg	Arg cgc	Arg cgg	Ala gcc	Glu gag	Ser tct	配列番号2
1	3	2	3	1	Gln cag	Arg agg	Trp tgg	Ala gcc	Glu gag	Ser tct	配列番号37 配列番号60
2	4	3	3	2	Thr acg	Gly ggg	Tyr tac	Ala gcc	Glu gag	Ser tct	配列番号38 配列番号61
3	4	1	3	1	Leu tcc	Ser agc	Asp gac	Ala gcc	Ala gcc	Arg cgc	配列番号39 配列番号62
4	3	—	3	0	Lys aag	Ala gcc	Gly ggc	Ala gct	Ser tcg	Thr acg	配列番号40 配列番号63
5	0	0	3	0	Arg agg	Ser tcg	His cac	Ser tcg	Gly ggc	Thr acc	配列番号9 配列番号23
6	1	—	3	1	Ser tcg	Arg cgg	Tyr tac	Ser tcc	Met atg	stop tag	配列番号10 配列番号24
7	1	—	2	1	His cac	Asn aac	Thr acg	Asp gac	Ser tcc	Asn aac	配列番号11 配列番号25
8	1	—	2	1	Arg cgc	Glu gag	His cac	Asn aac	Asn aac	Ala gcg	配列番号12 配列番号26
9	1	—	2	1	Ser agc	Pro ccc	Met atg	Ala gcc	Asn aac	Pro ccc	配列番号13 配列番号27
10	1	1	1	4	Leu ctg	Arg cgc	Arg cgg	Lys aag	Asp gac	Thr acg	配列番号14 配列番号28
11	0	0	0	3	Leu ctg	Arg cgc	Arg cgg	Arg cgg	Thr acg	Asp gac	配列番号15 配列番号29
12	1	1	1	3	Leu ctg	Arg cgc	Arg cgg	Arg agg	Glu gag	Thr acg	配列番号16 配列番号30
13	2	2	2	4	Leu ctg	Arg cgc	Arg cgg	Ala gcc	Asp gac	Asp gac	配列番号17 配列番号31
14	2	2	2	3	Leu ctg	Arg cgc	Arg cgg	Ala gcc	Asn aac	Asp gac	配列番号18 配列番号32

[0035] [表2]

クローン番号	バイオアッセイ		受容体		変異位置と変異後のアミノ酸残基及びそのコドン						備考
	HEp-2	L-M	TNF-R1	TNF-R2	84	85	86	87	88	89	
TNF- α (対照)	3	3	3	3	Ala gcc	Val gtc	Ser tcc	Tyr tac	Gln cag	Thr acc	配列番号1
15	2	2	2	1	Thr acc	Asn aac	His cac	Tyr tac	Ser tcg	Asn aac	
16	4	4	4	2	Ser agc	Ser tcg	Thr acc	Tyr tac	Pro ccc	Asp gac	配列番号41 配列番号64
17	4	4	3	1	Ser tcg	Lys aag	Thr acc	Tyr tac	Thr acc	His cac	配列番号42 配列番号65
18	4	4	4	1	Ser tcc	Pro ccc	Leu ctg	Tyr tac	Pro ccc	Lys aag	配列番号43 配列番号66
19	4	4	4	1	Ser tcc	Tyr acc	Asn aac	Tyr tac	Asn aac	Gly ggc	配列番号44 配列番号67
20	3	4	3	2	Ser tcc	Ser agc	Ala gcg	Tyr tac	Ala gcg	Ser agc	配列番号45 配列番号68
21	4	4	4	1	Thr tcg	Ser tcg	Ala gcc	Tyr tac	Gly ggg	Pro ccg	配列番号46 配列番号69
22	4	4	3	1	Ser tcg	Arg cgc	Val gtg	Tyr tac	Thr acc	Ala gcc	配列番号47 配列番号70
23	4	4	4	1	Thr acg	Thr acg	Ala gcg	Tyr tac	Ser agc	Gly ggc	配列番号48 配列番号71
24	4	4	4	1	Thr acg	His cac	Lys aag	Tyr tac	Pro ccg	Gln cag	配列番号49 配列番号72
25	4	3	4	1	Ser agc	Lys aag	Thr acc	Tyr tac	Ser tcc	His cac	配列番号50 配列番号73
26	4	2	4	1	Ser tcg	Ser tcc	His cac	Tyr tac	Arg agg	Phe ttc	配列番号51 配列番号74
27	3	4	3	2	Thr acc	Pro ccc	Ala gcc	Tyr tac	Pro ccc	Arg cgg	配列番号52 配列番号75
28	3	3	3	1	Thr acg	Lys aag	Ser tcc	Tyr tac	Ser tcc	Lys aag	配列番号53 配列番号76
29	4	4	3	1	Thr acc	Glu gag	Gln cag	Tyr tac	Ser tcc	His cac	配列番号54 配列番号77
30	4	4	3	2	Thr acg	Pro ccc	Gly cag	Tyr tac	Pro ccg	Ser tcc	配列番号55 配列番号78
31	4	4	4	3	Ser agc	Lys aag	Thr acc	Tyr tac	Ser tcc	His cac	配列番号56 配列番号79
32	3	4	4	2	Thr acg	Asp gac	Arg cgc	Tyr tac	Ser agc	Ser agc	配列番号57 配列番号80
33	3	3	4	1	Asn aac	His cac	Arg agg	Tyr tac	Gln cag	Asp gac	配列番号58 配列番号81
34	4	3	3	2	Ser tcc	Ala gcg	Asp gac	Tyr tac	Pro ccc	His cac	配列番号59 配列番号82
35	0	0	4	0	Thr acc	Pro ccc	Ala gcc	Ile atc	Asn aac	Arg cgg	配列番号19 配列番号33
36	1	1	3	1	Ala gcg	Pro ccc	Gly ggc	Tyr tac	Ser tcc	His cac	配列番号20 配列番号34
37	1	1	3	1	Ser agc	Thr acc	Thr acc	His cac	Asn aac	Gln cag	配列番号21 配列番号35
38	1	1	3	1	Gly ggc	Gly ggc	Pro ccg	Tyr tac	Gln cag	Arg cgg	配列番号22 配列番号36

[0036] 表1に示すとおり、対照のTNF- α とTNFリジン変換体は同じ程度の細胞障害活性及びTNF受容体への結合力を示した。また、TNFリジン変換体を基にして作製さ

れたTNF変異体蛋白質においては、クローン番号1乃至4のTNF変異体蛋白質は、TNF-R1への結合力は同等、TNF-R2への結合力は弱く、HEp-2細胞及びL-M細胞を用いたバイオアッセイでは細胞障害活性を示した。一方、クローン番号5乃至9のTNF変異体蛋白質は、TNF-R1への結合力は同等または同等以下、TNF-R2への結合力は極めて弱く、HEp-2細胞及びL-M細胞を用いたバイオアッセイでは細胞障害活性が極めて減弱されていた。この結果から、これらのクローンはすべてTNF-R1特異性のTNF変異体蛋白質であるものの、クローン番号1乃至4のTNF変異体蛋白質はTNF-R1特異的なTNFアゴニスト、クローン番号5乃至9のTNF変異体蛋白質はTNF-R1特異的なTNFアンタゴニストであることが判明した。また、クローン番号10乃至14のTNF変異体蛋白質は、TNF-R2への結合力は対照の組換え型TNF- α と同等又は同等以上、TNF-R1への結合力は極めて弱く、HEp-2細胞及びL-M細胞を用いたバイオアッセイでは細胞障害活性が極めて減弱されていた。この結果から、クローン番号10乃至14のTNF変異体蛋白質は、TNF-R2特異的なTNFアンタゴニストであることが判明した。

[0037] また、表2に示すとおり、対照のTNFリジン変換体と比較して、クローン番号16乃至34のTNF変異体蛋白質は、TNF-R1への結合力は同等又は同等以上、TNF-R2への結合力は同等又は同等以下であり、HEp-2細胞及びL-M細胞を用いたバイオアッセイではほぼ同等の細胞障害活性を示した。一方、クローン番号35乃至38のTNF変異体蛋白質は、TNF-R1への結合力は同等であり、TNF-R2への結合力は極めて弱く、バイオアッセイでは細胞障害活性が極めて減弱していた。この結果から、これらのクローンはTNF-R1特異的なTNF変異体蛋白質であるものの、クローン番号16乃至34のTNF変異体蛋白質はTNF-R1特異的なTNFアゴニスト、クローン番号35乃至38のTNF変異体蛋白質はTNF-R1特異的なTNFアンタゴニストであることが判明した。

[0038] 実験例2: TNF拮抗阻害活性

上記クローン番号35乃至38のTNFアンタゴニストについて、拮抗阻害活性をさらに詳細に調べた。10ng/mlの常法の遺伝子工学技術を用いて製造した組換え型ヒトTNF- α と下記表3の濃度のTNFアンタゴニストを含む培養培地を用いて、TNF-

R1のみを多量に細胞膜表面に発現しているHEp-2細胞、または、TNF-R1及びTNF-R2を発現しているL-M細胞(TNF-R1の発現量はHEp-2よりも少ない)の生存率(値が小ほどTNFの細胞障害活性が強い)を測定した。結果を表3に示す。

[0039] [表3]

TNF アンタゴニスト (ng/ml)		TNF- α (ng/ml)	生存率(%)	
			HEp-2	L-M
0		10	9	17
クローン 番号35	1,000	10	10	43
	10,000	10	18	58
	100,000	10	86	61
	500,000	10	103	64
クローン 番号36	1,000	10	12	43
	10,000	10	13	54
	100,000	10	38	63
	500,000	10	74	59
クローン 番号37	1,000	10	11	42
	10,000	10	18	51
	100,000	10	43	59
	500,000	10	75	72
クローン 番号38	1,000	10	11	42
	10,000	10	22	47
	100,000	10	72	58
	500,000	10	95	70

[0040] 表3に示すとおり、強い細胞障害活性を示す10ng/mlの組換え型ヒトTNF- α 存在下、HEp-2細胞の生存率は、100,000ng/ml以上の濃度のTNFアンタゴニストの添加により、生存率9%から、実験に供した各クローンにおいて、それぞれ86%、38%、43%又は72%に増加し、組換え型ヒトTNF- α の細胞障害作用が部分的に打ち消されていた。さらに、TNFアンタゴニスト500,000ng/mlの濃度では、生存率はそれぞれ103%、74%、75%、95%となり、ほぼTNF- α の細胞障害作用が打ち消された。一方、TNFアンタゴニストの添加により、L-M細胞では、生存率17%から、1,000ng/mlの濃度で生存率がそれぞれ43%、43%、51%、47%となったが、500,000ng/mlの濃度でも生存率が64%、59%、72%、70%にまでし

か回復しなかった。この結果は、クローン番号35乃至38のTNFアンタゴニストは、TNF-R1のみを豊富に発現するHEp-2細胞に対しては、TNFの作用を打ち消すために比較的高濃度のTNF変異体蛋白質を必要とするものの、HEp-2細胞はTNF-R2を発現していないゆえに、高濃度のTNFアンタゴニストによって、TNFの作用を完全に打ち消すことが可能であり、これに対して、TNF-R1及びTNF-R2の両方を発現するL-M細胞に対しては、TNF-R1を介してのTNFの作用はTNF-R1の発現数が少ないために容易に打ち消すことができるものの、TNF-R2によって介してのTNFの作用を打ち消すことができないので、高濃度のTNFアンタゴニストによってもTNF- α の細胞障害作用を打ち消すことができないと考えられた。したがって、この結果は、この発明のTNFアンタゴニストは、TNF-R1特異性を有していることを物語っている。

[0041] 実験例3: TNF変異体蛋白質と水溶性の高分子との複合体の調製

実験例1の方法により得た14種類のTNFアンタゴニスト(クローン番号5乃至14、35乃至38)又は23種類のTNFアゴニスト(クローン番号1乃至4、16乃至34)を磷酸緩衝生理食塩水(pH7.2)に濃度0.1乃至1mg/mlになるように溶解した後、水溶性の高分子としてモノメトキシN-サクシンイミジルプロピオネートにより活性化させたポリエチレングリコール(m-PAG-SPA、平均分子量5,000ダルトン)をモル比で蛋白質の3倍になるように加え、37℃で30分間反応させた。次いで、反応混合物へ ϵ -アミノカプロン酸をモル比で水溶性の高分子の10倍量加え、暫時静置して反応を停止させた後、反応混合物を陰イオン交換クロマトカラム(商品名『Mono S』、アマシャムバイオサイエンス社製)によりHPLC分画して蛋白質に結合していないポリエチレングリコールを除去して、この発明のTNF変異体蛋白質を水溶性の高分子に結合した複合体を得た。これらのうちのTNFアンタゴニスト14種を、HEp-2細胞を用いた実験例2に記載の競合試験に供し、同様にしてTNF拮抗阻害活性を測定したところ、ポリエチレングリコールを結合していないそれぞれのTNFアンタゴニストの約70%のTNF拮抗阻害活性を有していることが判明した。

[0042] 実験例4: 急性毒性試験

常法にしたがって、8週齢の雄性マウス(体重20乃至25g)に実験例1で得た14種

類のTNFアンタゴニスト(クローン番号5乃至14、35乃至38)又は23種類のTNFアゴニスト(クローン番号1乃至4、16乃至34)、又は、実験例3の方法により得た14種類のTNFアンタゴニスト又は23種類のTNFアゴニストとポリエチレングリコールが結合した複合体のいずれかを、経皮、経口又は腹腔経路で注射投与したところ、TNFアンタゴニスト及びそれとポリエチレングリコールが結合した複合体のLD₅₀は、いずれの投与経路においても100mg/kg体重以上であった。このことは、この発明のTNF変異体蛋白質及びそれとポリエチレングリコールが結合した複合体がヒトやウシなどの家畜への投与を前提とする医薬品として、又は医薬品に配合して用いることが安全であることを物語っている。

[0043] 以下、この発明の実施の形態につき、実施例に基づいて説明する。

[0044] 実施例1:液剤

安定剤として1%(w/w)人血清アルブミンを含む生理食塩水に実験例1の方法により得た14種類のTNFアンタゴニスト(クローン番号5乃至14、35乃至38)、23種類のTNFアゴニスト(クローン番号1乃至4、16乃至34)又は実験例3の方法により得た14種類のTNFアンタゴニストとポリエチレングリコールとの複合体のいずれかを100mg/mlになるように溶解し、常法にしたがって精密濾過して滅菌して液剤を得た。

[0045] 本品は、悪性腫瘍、ウイルス性疾患、細菌感染症、炎症性疾患及び免疫疾患をはじめとする感受性疾患を治療又は予防、及び症状を緩和するための注射剤、点眼剤及び点鼻剤などとして有用である。

[0046] 実施例2:液剤

安定剤として1%(w/w)人血清アルブミンを含む生理食塩水に実験例1の方法により得た14種類のTNFアンタゴニスト(クローン番号5乃至14、35乃至38)、23種類のTNFアゴニスト(クローン番号1乃至4、16乃至34)又は実験例3の方法により得た14種類のTNFアンタゴニストとポリエチレングリコールを結合した複合体のいずれかを10mg/ml、組換え型ヒトTNF- α を1 μ g/mlになるように溶解し、常法にしたがって精密濾過して滅菌して液剤を得た。

[0047] 本品は、悪性腫瘍、ウイルス性疾患、細菌感染症、炎症性疾患及び免疫疾患をはじめとする感受性疾患を治療又は予防、及び症状を緩和するための注射剤、点眼剤

及び点鼻剤などとして有用である。

[0048] 実施例3: 乾燥注射剤

安定剤として1% (w/w) 精製ゼラチンを含む生理食塩水100mlに、実験例3の方法により得た14種類のTNFアンタゴニスト(クローン番号5乃至14、35乃至38)とポリエチレングリコールとの複合体のうちのいずれかを1g、欧州公開特許EP1354893号明細書の実施例2で得た生理活性複合体(本出願明細書の配列表における配列番号2で表される塩基配列に併記されるアミノ酸配列を有するTNFリジン変換体とポリエチレングリコールとの複合体)を0.1mg溶解し、常法にしたがって精密濾過により滅菌し、バイアル瓶に1mlずつ分注し、凍結乾燥させた後、密栓して乾燥注射剤を得た。

[0049] 本品は、悪性腫瘍、ウイルス性疾患、細菌感染症、炎症性疾患及び免疫疾患をはじめとする感受性疾患を治療又は予防、及び症状を緩和するための注射剤、点眼剤及び点鼻剤などとして有用である。

[0050] 実施例4: 軟膏剤

滅菌蒸留水にカルボキシビニルポリマー(商品名『ハイビスワコー』、株式会社和光純薬工業製造)とパイロジェンを除去した高純度トレハロース(商品名『トレハ』、株式会社林原製造)とをそれぞれ濃度1.4% (w/w) 及び2.0% (w/w) になるように溶解した後、実験例1の方法により得た14種類のTNFアンタゴニスト(クローン番号5乃至14、35乃至38)又は23種類のTNFアゴニスト(クローン番号1乃至4、16乃至34)のいずれかの適量を均一に混合し、pH7.2に調製して、1g当りTNFアンタゴニスト又はTNFアゴニストを約10 μ g含むペースト状物を得た。

[0051] 延展性と安定性に優れた本品は、悪性腫瘍、ウイルス性感染、又は、細菌感染症や、TNFに起因する炎症、アレルギーなどの疾患の治療・予防するための軟膏剤として有用である。

[0052] 実施例5: 錠剤

無水結晶性 α -マルトース粉末(商品名『ファイントース』、株式会社林原製造)に実験例3の方法により得た14種類のTNFアンタゴニスト(クローン番号5乃至14、35乃至38)とポリエチレングリコールとの複合体のいずれかの適量を、それに対してモル

比で10,000分の1量の欧州公開特許EP1354893号明細書の実施例2の方法により得られたTNF活性を有する生理活性複合体(本出願明細書の配列表における配列番号2で表される塩基配列に併記されるアミノ酸配列を有するTNFリジン変換体とポリエチレングリコールとの複合体)を均一に混合し、得られた混合物を常法により打錠して製品1錠(約200mg)当たりTNFアンタゴニスト活性を有する生理活性複合体を約10mg、TNF活性を有する生理活性複合体を約1 μ g含む錠剤を得た。

- [0053] 摂取性、安定性に優れた本品は、悪性腫瘍、ウイルス性感染、細菌感染症、炎症性疾患及び免疫疾患をはじめとする感受性疾患を治療・予防するための錠剤として有用である。

産業上の利用可能性

- [0054] 以上説明したとおり、この発明のTNFアンタゴニスト又はそれを有効成分とするTNF阻害剤は、TNF-R1又はTNF-R2を介してのTNFの作用を抑制することができるので、医薬品の分野において、例えば、抗腫瘍剤、抗ウイルス疾患剤、抗感染症剤、炎症性疾患剤、免疫疾患剤などとして多種多様の用途を有する。また、TNF-R1に対して特異的に結合するTNFアゴニストは、野性型TNFとは異なった生物作用が発揮されることが期待される。さらに、この発明のTNF変異体蛋白質は、ポリエチレングリコールなどの水溶性の高分子と結合させることにより、生体内の安定性を高めることが可能であるので、医薬品への利用に極めて有利である。

請求の範囲

- [1] 配列表における配列番号1で表されるアミノ酸配列におけるN末端から29、31、32、145、146及び147番目のアミノ酸残基又は84乃至89番目のアミノ酸残基のうち、1又は2以上が他のアミノ酸残基で置換されている腫瘍壊死因子変異体蛋白質。
- [2] 配列表における配列番号1で表されるアミノ酸配列におけるN末端から29番目のアミノ酸残基がアルギニン、ヒスチジン又はセリン、31番目がアルギニン、アスパラギン、グルタミン酸、プロリン又はセリン、32番目がヒスチジン、メチオニン、トレオニン又はチロシン、145番目がアラニン、アスパラギン、アスパラギン酸又はセリン、146番目がアスパラギン、グリシン、メチオニン又はセリン、及び、147番目がアラニン、アスパラギン、プロリン、トレオニン又は終止コドンで置換されているか、145番目がアラニン、リジン又はアルギニン、146番目がグルタミン酸、アスパラギン、アスパラギン酸又はトレオニン、及び、147番目がトレオニン又はアスパラギン酸で置換されているか、又は84番目がアラニン、トレオニン、セリン又はグリシン、85番目がプロリン、トレオニン又はグリシン、86番目がアラニン、グリシン、トレオニン又はプロリン、87番目がチロシン、イソロイシン又はヒスチジン、88番目がグルタミン、アスパラギン又はセリン、及び、89番目がアルギニン、ヒスチジン又はグルタミンで置換されており、かつ、腫瘍壊死因子に対してアンタゴニスト作用を有する請求項1に記載の腫瘍壊死因子変異体蛋白質。
- [3] 配列表における配列番号1で表されるアミノ酸配列におけるN末端から29番目がロイシン、グルタミン、トレオニン又はリジン、31番目がアルギニン、グリシン、セリン又はアラニン、32番目がトリプトファン、チロシン、アスパラギン酸又はグリシン、

146番目がグルタミン酸、アラニン又はセリン、及び、
147番目がセリン、アルギニン又はトレオニン
で置換されているか、又は、
84番目がトレオニン、セリン又はアスパラギン、
85番目がセリン、リジン、プロリン、チロシン、アルギニン、トレオニン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸又はアラニン、
86番目がヒスチジン、トレオニン、ロイシン、アスパラギン、アラニン、バリン、リジン、セリン、グルタミン、グリシン、アルギニン又はアスパラギン酸、
88番目がセリン、プロリン、トレオニン、アスパラギン、アラニン、グリシン、アルギニン又はグルタミン、及び、
89番目がアスパラギン酸、ヒスチジン、リジン、グリシン、セリン、プロリン、アラニン、グルタミン、フェニルアラニン又はアルギニン
で置換されており、かつ、腫瘍壊死因子に対してアゴニスト作用を有する請求項1に記載の腫瘍壊死因子変異体蛋白質。

- [4] 配列表における配列番号9乃至22で表されるアミノ酸配列のいずれか、又はそれらのアミノ酸配列のN末端から11、65、90、98、112及び128番目のアミノ酸残基から選ばれる1又は2以上のアミノ酸残基がリジン残基である蛋白質であり、腫瘍壊死因子に対してアンタゴニスト作用を有することを特徴とする、請求項2に記載の腫瘍壊死因子変異体蛋白質。
- [5] 配列表における配列番号37乃至59で表されるアミノ酸配列のいずれか、又はそれらのアミノ酸配列のN末端から11、65、90、98、112及び128番目のアミノ酸残基から選ばれる1又は2以上のアミノ酸残基がリジン残基である蛋白質であり、腫瘍壊死因子に対してアゴニスト作用を有することを特徴とする、請求項3に記載の腫瘍壊死因子変異体蛋白質。
- [6] 水溶性高分子と結合していることを特徴とする請求項1に記載の腫瘍壊死因子変異体蛋白質。
- [7] 水溶性の高分子がポリエチレングリコールであることを特徴とする請求項6に記載の腫瘍壊死因子変異体蛋白質。

- [8] 請求項2に記載の腫瘍壊死因子変異体蛋白質を含んでなる腫瘍壊死因子阻害剤。
- [9] 請求項3に記載の腫瘍壊死因子変異体蛋白質を含んでなる腫瘍壊死因子製剤。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000032

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl.⁷ C07K14/525, A61K38/00, 47/48//C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl.⁷ C07K14/525, A61K38/00, 47/48, C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

REGISTRY (STN), BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/BIOTECHABS/CA (STN), JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5606023 A (Thomas Jefferson University), 25 February, 1997 (25.02.97), (Family: none)	1, 2, 4, 6-8
Y	Loetscher H. et al., Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors, J.Biol.Chem., 1993, Vol.268, pages 26350 to 26357	1, 2, 4, 6-8
Y	Yasuo Tsutusmi et al., "Phage Hyomen Teijiho o Kushishita Kinosei Jinko Tanpakushitsu no Soshutsu to DDS eno Tenkai", Drug Delivery System, 2003, Vol.18, pages 536 to 544	1, 2, 4, 6-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
06 April, 2005 (06.04.05)Date of mailing of the international search report
19 April, 2005 (19.04.05)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000032

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claim 1 involves a plural number of tumor necrosis factor mutant proteins which are common to each other in binding specifically to TNF-R1 or TNF-R2 and divided into those having an antagonism to tumor necrosis factor and those having an agonism to tumor necrosis factor. Since there has been reported by, for example, document JP 7-285997 A an agonist specifically binding to TNF-R1 which is a tumor necrosis factor mutant protein having substitution at the amino acid residue at the 86-position "from the N-end in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 in Sequence Listing", "binding specifically to either TNF-R1 or TNF-R2" cannot be considered as a technical feature making a contribution over prior art. (continued to extra sheet)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

The parts relating to a tumor necrosis factor mutant protein having an antagonism in claims 1, 6 and 7 and claims 2, 4 and 8.

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000032

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

Such being the case, the tumor necrosis factor mutant proteins involved in claim 1 are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

Also, claim 3 involves a plural number of tumor necrosis factor mutant proteins which are common to each other in specifically binding to either TNF-R1 or TNF-R2 and having an agonism to tumor necrosis factor. However, there has been already known an agonist specifically binding to TNF-R1 which is a tumor necrosis factor mutant protein having substitution at the amino acid residue at the 86-position "from the N-end in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 in Sequence Listing" as described above, "being an agonist binding specifically to either TNF-R1 or TNF-R2" cannot be considered as a technical feature making a contribution over prior art. Such being the case, the tumor necrosis factor mutant proteins involved in claim 3 are not considered as being so linked as to form a single general inventive concept.

The same applied to claim 5, too.

Thus, claims 1 to 9 have 24 inventions including the invention relating to an antagonist binding specifically to either TNF-R1 or TNF-R2 and the inventions relating respectively to the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:37 to 59.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C07K14/525, A61K38/00, 47/48 // C12N15/09		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. ⁷ C07K14/525, A61K38/00, 47/48, C12N15/09		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) REGISTRY (STN) BIOSIS/MEDLINE/WPIDS/BIOTECHABS/CA (STN) JICST ファイル (JOIS)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	US 5606023 A (Thomas Jefferson University) 1997.02.25 (ファミリーなし)	1, 2, 4, 6-8
Y	Loetscher H. et al., Human tumor necrosis factor alpha (TNF alpha) mutants with exclusive specificity for the 55-kDa or 75-kDa TNF receptors, J.Biol.Chem., 1993, Vol.268, p.26350-26357	1, 2, 4, 6-8
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 06.04.2005	国際調査報告の発送日 19.04.2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 深草 亜子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4B 9548

C (続き) .. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	堤康央他, ファージ表面提示法を駆使した機能性人工蛋白質の創出 と DDS への展開, Drug Delivery System, 2003, Vol.18, p.536-544	1, 2, 4, 6-8

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲1には複数の腫瘍壊死因子変異体蛋白質が含まれているが、これらはTNF-R1又はTNF-R2のどちらかに特異的に結合するものである点で共通しており、腫瘍壊死因子に対してアンタゴニスト作用を有するものとアゴニスト作用を有するものに分けられる。例えば文献JP 7-285997 Aには、「配列表における配列番号1で表されるアミノ酸配列におけるN末端」から86番目のアミノ酸残基が置換された腫瘍壊死因子変異体蛋白質であって、TNF-R1に特異的に結合するアゴニストが記載されているから、「TNF-R1又はTNF-R2のどちらかに特異的に結合する」ことをもって、先行技術に対して貢献する技術的特徴と認めることはできない。よって、請求の範囲1に含まれる複数の腫瘍壊死因子変異体蛋白質は、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているとは認められない。

（特別ページに続く）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

請求の範囲1、6、7のうちアンタゴニスト作用を有する腫瘍壊死因子変異体蛋白質に関する部分及び請求の範囲2、4、8

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

第Ⅲ欄の続き

請求の範囲 3 にも複数の腫瘍壊死因子変異体蛋白質が含まれており、これらは TNF-R1 又は TNF-R2 のどちらかに特異的に結合するものであって、腫瘍壊死因子に対してアゴニスト作用を有する点で共通している。しかし上述の通り、「配列表における配列番号 1 で表されるアミノ酸配列における N 末端」から 86 番目のアミノ酸残基が置換された腫瘍壊死因子変異体蛋白質であって、TNF-R1 に特異的に結合するアゴニストが既に知られているから、「TNF-R1 又は TNF-R2 のどちらかに特異的に結合するアゴニスト」であることをもって、先行技術に対して貢献する技術的特徴と認めることはできない。よって、請求の範囲 3 に含まれる複数の腫瘍壊死因子変異体蛋白質は、単一の一般的発明概念を形成するように連関しているとは認められない。

請求の範囲 5 についても同様である。

したがって、請求の範囲 1 - 9 には、「TNF-R1 又は TNF-R2 のどちらかに特異的に結合するアンタゴニストに関する発明、及び配列番号 37 乃至 59 で表されるアミノ酸配列のいずれかに関する発明という、24 の発明が記載されている。